云 南 植 物 研 究 8(3): 333—342, 1986
Acta Botanica Yunnanica

玉米素核苷的酶标免疫测定法

徐如涓　季本仁　段金玉

（中国科学院昆明植物研究所）

摘要　牛血清白蛋白-玉米素核苷（BSA-ZR）的兔抗血清对玉米素核苷具有很高的亲和性[8]，而且专一性强，除了玉米素外，对其它一些细胞分裂素如激动素（KT）的交叉反应甚微。用辣根过氧化物酶（HRP）作为标记物的酶标免疫法，由于它的灵敏度高，相当于几十毫克量的样品就可以测出细胞分裂素的含量。测定范围在0.25—50pmol之间，测定范围较广。由于该方法专一性高，植物组织的粗提取物可以直接用于测定。避免了提取分离的繁琐程序，使得测定方法较简便、快速，可成批进行，适用于一般实验室。用该方法测得风信子（*Hyacinthus orientalis* L.）各部分的细胞分裂含量（以玉米素核苷计）在10—60×10^{-9}克/克鲜重，即10—60ng/g F. W.。

关键词　细胞分裂素；玉米素核苷；酶标免疫测定

1941年，Folke Skoog和他的同事们在美国威斯康辛大学从事组织培养研究时，发现了细胞分裂素。1955年Miller等分离得到、并定出结构的第一种细胞分裂素是激动素[5、6]。至今已三十年了。几十年来，国内外许多科研工作者在定性和定量细胞分裂素方面做了大量的工作。但就定量工作而言，大多数都依赖于生物测试法。MacMillan在他的“Hormonal regulation of development Ⅰ”一书中较系统地介绍了各种生物测试法的作者和测定限度[4]。同时在该书中例叙了几种物理化学检测法，如紫外分光光度法、荧光分光法、电子化学法等。物理化学法与生物测试法比较，虽具有灵敏、准确等优点，但一般说来它们要求样品纯度高、样品量大，这就给取样及提取分离提出了高要求。同样，植物化学法所需样品量也大，分离步骤复杂，易受杂质干扰，而且一般要在微克量以上才能测出，因而不能被广泛应用。

七十年代Fuchs, Gertman, Pengelly, Meices[4], Weiller[8]，等首先将免疫学方法应用于植物内源激素的测定。Weiller在1980年发表了放射免疫测定玉米素核苷的方法，就其方法的专一性，灵敏度讲，比起生物学法、物理化学法和植物化学法都优越得多，不失为是一种值得推广的方法。但放射免疫法并不适用于普通实验室，首先要配有较完善的同位素实验室设备，而且同位素标记的化合物的寿命由同位素半衰期限定。鉴于这些原因，参考前人方法，用酶标免疫法测定植物内源细胞分裂素。酶标免疫法有其独特的优点，首先它不需要同位素实验室及设备，也不需顾虑同位素来源的难易，酶标记的方法也容易掌握，所用试剂均易得到，一般实验室均有条件采用。

本文于1985年9月1日收到。

材 料 和 方 法

（一）免疫方法及抗原、抗体的制备

1.抗原的制备

玉米素核苷（ZR）是一半抗原，要得到ZR的特异性抗体，必须将ZR共价联接到载体蛋白上。本实验中用牛血清白蛋白（BSA）作为载体蛋白，用过碘酸盐氧化法将ZR共价结合在蛋白质的ε-NH_2上，这个方法的原始资料来源于Erlang和Beiser（1964）[2]研究BSA-Ad（腺苷）的合成，后稍经修改，方法基本与Weiller相同。原理见文献[1]。

室温下10毫克玉米素核苷悬浮于1毫升甲醇中，边搅拌，边逐滴加入5毫升0.01M的$NaIO_4$，溶液继续搅拌后，加入0.3毫升0.1M的乙二醇，搅拌5分钟，以除去过量的$NaIO_4$。

110毫克牛血清白蛋白溶于5毫升H_2O中，用5%K_2CO_3将溶液pH调至9.3—9.7。将上述氧化的ZR溶液滴加入其中，并继续用5%K_2CO_3保持反应液pH9.3—9.7。将反应液移置4°C，搅拌60分钟后加入5毫克$NaBH_4$，再搅拌40分钟，又加入5毫克$NaBH_4$，然后用1M HAc调pH至6.5。溶液继续搅拌2小时，最后溶液在4°C透析3天，更换透析液3次，冷冻干燥，于－20°C保存。总重得率91%。假设蛋白质与ZR在结合前后紫外吸收值不变，BSA的分子量的变化也略而不计，则ZR/BSA结合的克分子比为3.2。测定方法如下：

称取1.25毫克ZR溶于25毫升容量瓶中，用水定容至刻度，1毫升相当于0.05毫克ZR，即相当于1.4×10^{-7}摩尔。

称取50毫克BSA溶于25毫升容量瓶中，用水定容至刻度，2.5毫升相当于5毫升BSA，即相当于0.7×10^{-7}摩尔。

称取5毫克BSA-ZR溶于10毫升H_2O中，以BSA分子量计，相当于含有BSA0.7×10^{-7}摩尔。

样品在Specord UV紫外分光光度计上扫描，见图1，2。测定273nm处的吸收值。标准曲线见图3，相关系数为0.999。

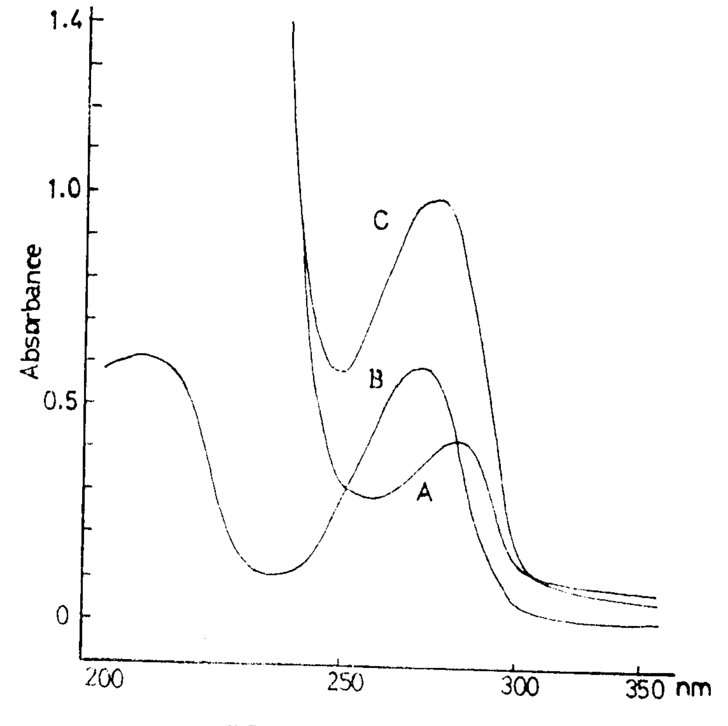


图1. BSA，ZR和BSA-ZR的紫外扫描

Fig. 1. UV spectra of BSA, ZR & BSA-ZR.

A：2mg/ml BSA solution

B：0.05mg/ml ZR solution

C：2mg/ml BSA-ZR solution

1cm-cells were used in above.

表1. 五个标样及BSA-ZR溶液

Table 1. Five standard samples & BSA-ZR solution

NO.	BSA ml	ZR ml	H_2O ml	*273nm Absor.	ZR/BSA ratio
1	2.5	0.5	7.0	0.58	1
2	2 5	1.0	6.5	0.76	2
3	2.5	1.5	6.0	0.96	3
4	2 5	2.0	5.5	1.12	4
5	2.5	2.5	5.0	1.28	5
BSA-ZR			BSA-ZR 10ml	0.98	3.2


* 1cm-cell

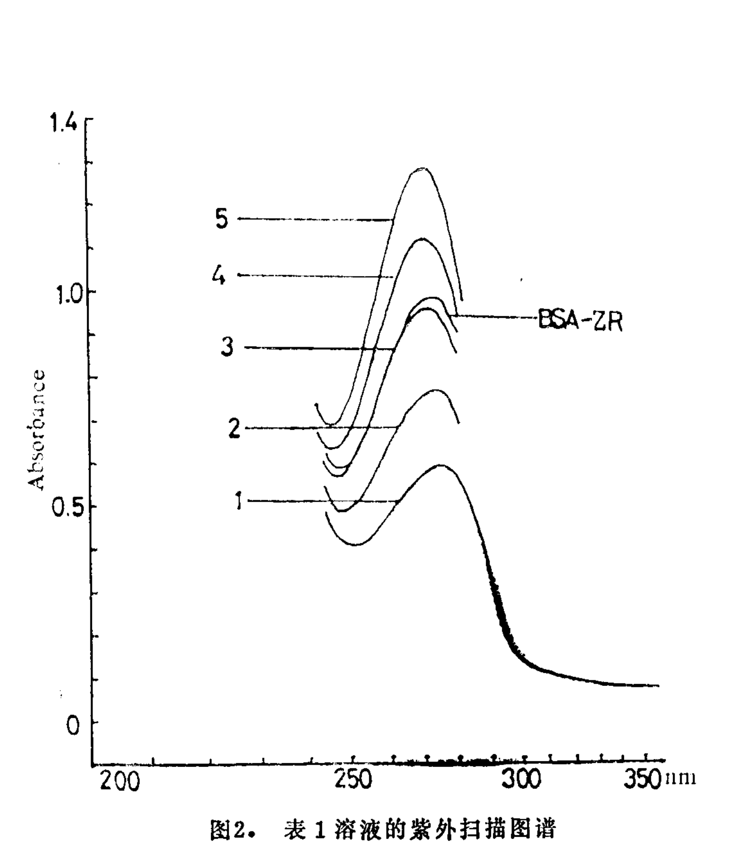


图2. 表 1 溶液的紫外扫描图谱

Fig. 2. UV spectra of the solutions listed in Table 1.

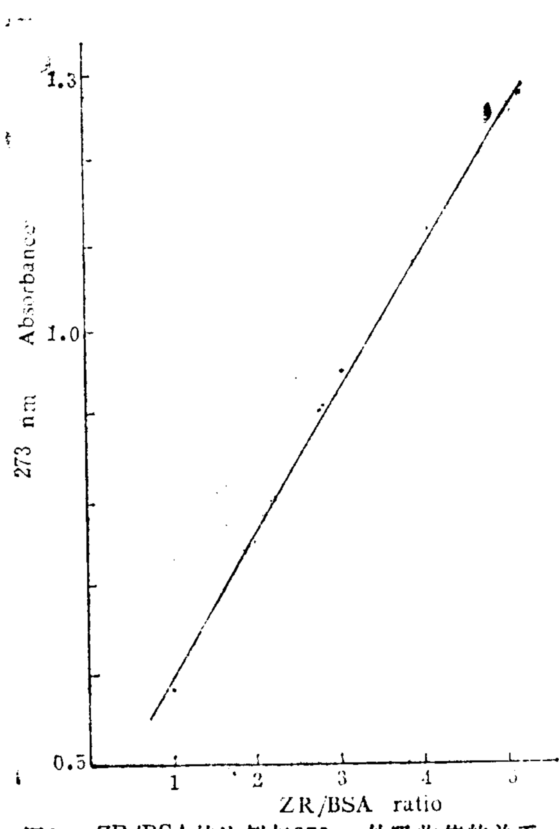


图3. ZR/BSA的比例与273nm处吸收值的关系

Fig. 3. The standard curve of relationship between ZR/BSA ratios and their absorbance at 273nm.

2.免疫途径及剂量

参照 B. A. L. Hurn and Shireen M. Chantler 所述方法，采取皮内注射途径制备抗血清，效果较好[3]，具体方法如下：

佐剂的制备　3 份石蜡油和 1 份羊毛脂混匀。以0.5毫克/毫升加入干燥的热灭活结核杆菌疫苗，混匀，即为完全福氏佐剂。如不加入热灭活结核杆菌疫苗，即为不完全福氏佐剂。

初次免疫剂量　将100微克 BSA-ZR 溶于 1 毫升生理盐水中，与 3 毫升完全福氏佐剂混合，充分乳化，直至成为油包水的乳化液（第二滴乳化液滴于水面不扩散）。按该剂量配制可注射二只家兔，即每只家兔实际注射抗原量为50微克。

强化注射量　每次每只家兔的强化注入的抗原量为其初次免疫剂量的一半，而且不完全福氏佐剂取代完全福氏佐剂。

免疫方法　选取3只12—16周的健康家兔，雌雄均可，但不要有亲缘关系。剪、刮去整个背部长毛，使用1毫升卡介苗注射器，4 1/2或5号注射针，在背部真皮内均匀地注射40—60针初次免疫剂，每针约40微升。6个星期后进行强化注射。强化注射时改用9号针，在前、后肢肌肉内注射，每针注射0.5—1毫升。一个月后若抗血清滴度仍提高不够，可再行强化注射一次，每周抽血检查，直至滴度满意，立即给予一次强化注射，一周后从兔颈动脉放血，收集全部血液，37°C温育2小时，4°C静置过夜，吸出上层血清。血清可用安培瓶封装，于－20°C保存。

免疫球蛋白的分离　抗血清中的特异抗体主要是IgG球蛋白，本实验采用DEAE-52作离子交换柱层析分离IgG。被分离的抗血清在0.015*M* pH7.4的磷酸缓冲液中透析过夜，DEAE-52也用同样的缓冲液充分平衡，装成2.2cm×18cm的层析柱，可分离5—8毫升抗血清，仍用0.015*M* pH7.4的磷酸缓冲液洗脱，收集第一峰，即为IgG(图4)。电泳表明，所得IgG球蛋白较纯（图5）

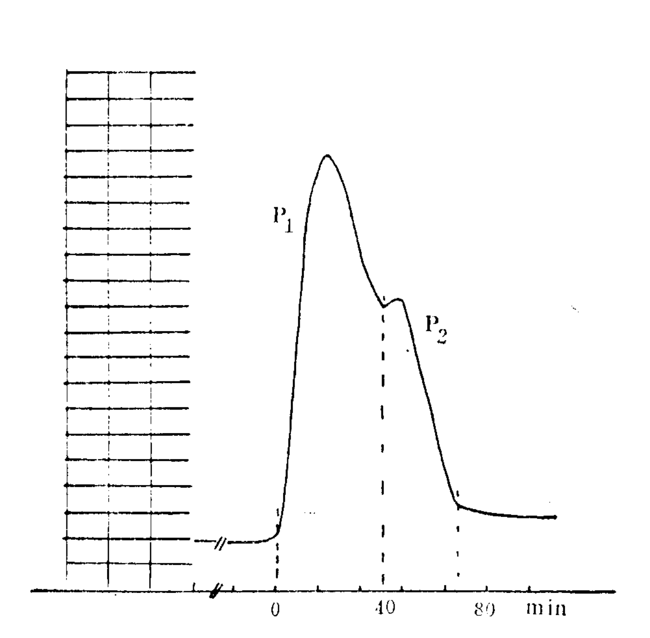


图4. IgG的DEAE-52柱层析，用GZS-01型紫外分析仪检测

Fig. 4. DEAE-52 cellulose chromatography of IgG (P_1 P_2) checked by GZS-01 ultraviolet absorption recorder. Eluent: 0.015M pH 7.4 PB buffer. Flow rate: 12ml/hr.

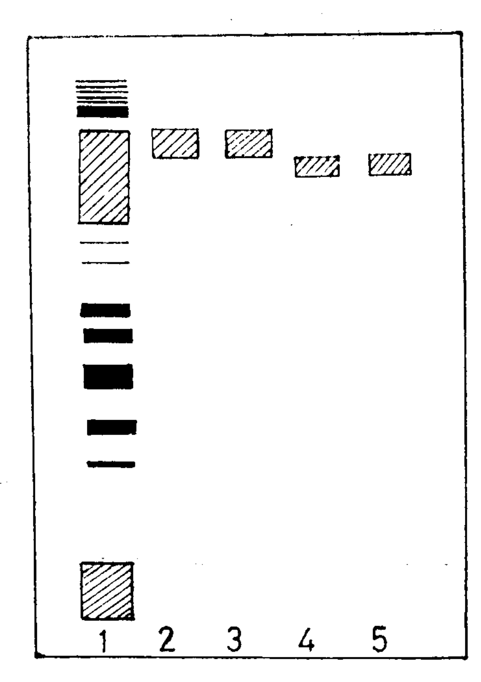


图5. 示血清和IgG的电泳图谱

1.全血清谱带；2、3. P_1谱带；4、5. P_2谱带。

Fig. 5. The electropherogram of bovine serum and IgG.

1. bovine serum, 2. 3. P_1, 4. 5. P_2

（二）酶标测定法

1. ZR的酶标

所用标记酶是辣根过氧化物酶（Horseradish peroxidase）简称HRP。HRP-ZR的合成反应原理与BSA-ZR合成相同。方法如下：

2毫克ZR悬浮于0.2毫升甲醇中，7分钟内逐滴加入1毫升0.01*M* $NaIO_4$溶液，溶液继续搅拌13分钟，加入100微升0.06*M*的乙二醇，搅拌5分钟后，反应液滴加入HRP溶液。

14毫克HRP溶于1毫升H_2O中，用5%K_2CO_3将pH调至9.3—9.7。在滴加入氧化ZR溶液过程中务必继续保持pH在9.5左右。60分钟后加入固体$NaBH_4$ 1毫克，搅

拌40分钟后再加入 1 毫克固体$NaBH_4$，随后用 1 M HAc调pH至6.5。HRP-ZR结合物在 4 °C透析 3 天，测得OD_{403}/OD_{269}为1.47，如图 6 B。溶液可在 0 °C保存，4 个月内不影响使用。

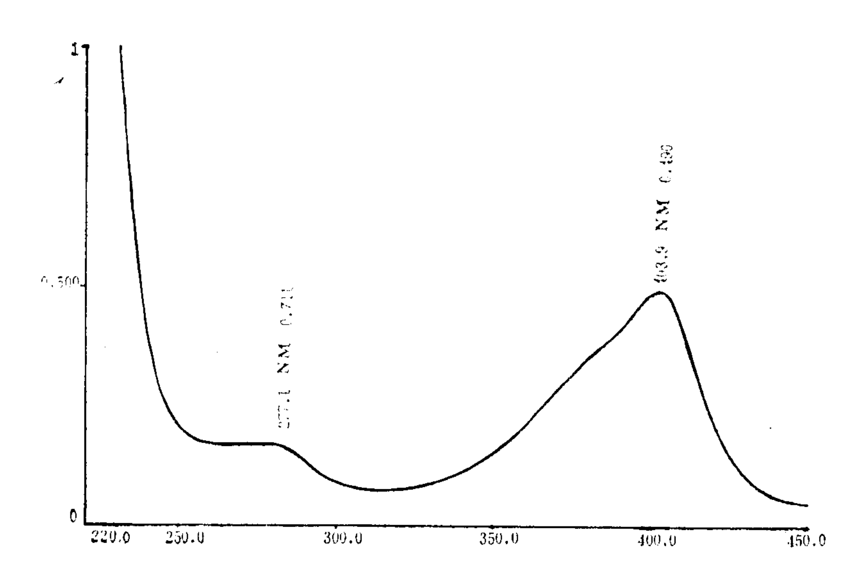


图6A. HRP在220nm～450nm区间的UV-VIS扫描图谱

Fig. 6A. UV-VIS spectrum of HRP solution from 220nm to 450nm.
Slit: 2nm; Sample conc. 0.53mg/ml; 1cm-cell.

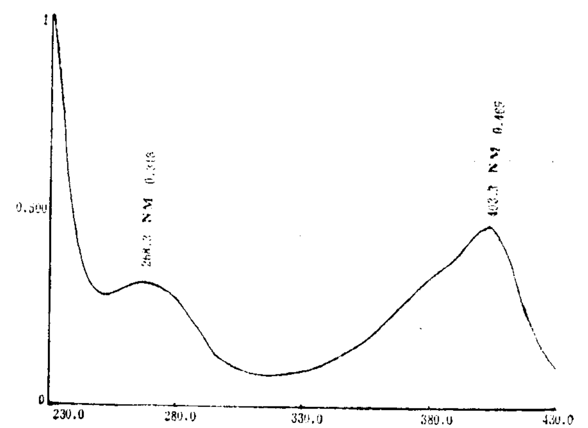


图6B. HRP-ZR在230nm～430nm区间的UV-VIS扫描图谱

Fig. 6B. UV-VIS spectrum of HRP-ZR solution from 230nm to 430nm.
Slit: 2nm; Sample conc. 0.57mg/ml; 1cm-cell

2.标准曲线的制作

（1）试剂的配制

IgG包埋液　从层析柱上收集的IgG溶液，直接用50mM pH9.6的$NaHCO_3$缓冲液稀释成1.25μg/ml的浓度。

标样配制液及样品定容液[1]均为50mM pH7.5 Tris-NaCl缓冲液，简称TBS。

洗涤液　每100毫升TBS内加入50微升Tween20。

酶反应底物　0.04%邻苯二胺和0.06%过氧化氢的混合液均用20mM的 pH 5.5的柠檬酸缓冲液配制。

终止酶反应液　6 N硫酸。

封锁液：用TBS配制0.01%的BSA。

（2）测定方法

免疫板上每孔加入300微升IgG包埋液，于4°C放置16小时后，弃去孔内IgG溶液（可收集重复复用）。此时小孔周壁已吸附了IgG。未被吸附的空白处用封锁液中的BSA弥补，即在室温下，每小孔内加满封锁液，静置15分钟，然后弃去孔内溶液。至此，免疫板备用于测定。

在吸附IgG的小孔内加满Tween洗涤液，室温静置5分钟，弃去，再冲洗二次。每孔内加200微升TBS，再加入50微升标准样品（以玉米素核苷配制，0.25—50pmol）或50微升待测样品，空白对照孔用50微升TBS取代样品液，非特异性结合孔加50微升标准样品（250pmol）。混均匀，于4°C放置1小时。然后各孔加入50微升HRP-ZR酶液（以酶量计约每孔20微克）。混匀，又在4°C放置2小时。此时，ZR和HRP-ZR竞争与特异性IgG结合，直至达到平衡。然后弃去各孔内溶液，与前相同洗涤三次。各孔加入300微升HRP反应底物，避光，在37°C温育40分钟，酶催化底物反应呈黄色，但各孔加入50微升6 N硫酸终止反应后，孔内溶液由黄变为桔红色，于491nm处测定各孔溶液的透过率T，根据下列公式[9]将T转化为logit B/B。

$$\text{logit } B/B_o(\%) = \ln\frac{B/B_o}{100 - B/B_o}$$

其中 $$B/B_o(\%) = \frac{(\lg T_{UB} - \lg T_B)}{(\lg T_{UB} - \lg T_{B_o})}$$

T_{UB}——非特异性结合孔所测透过率

T_o——空白对照孔所测透过率

T——标准样品或待测样品所测透过率

测定方法中抗体与ZR的结合是采用的竞争法，如图7所示。

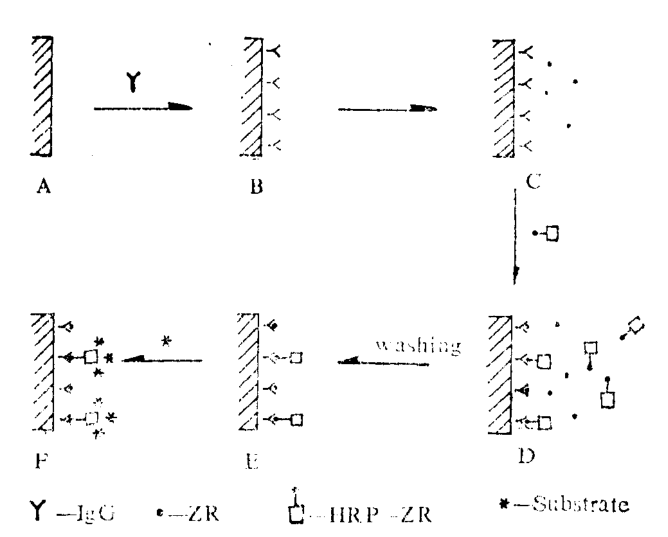


图7. 固相化酶标免疫示意图

A. 小孔壁；B. 包埋；C. 温育；D. 加入标有酶的样品；E. 洗涤；F. 酶活性测定。

Fig. 7. Performarice of the ZR solid-phase enzyme immunoassay.

A. the wall of well; B. coating; C. incubation with standard or sample; D. addition of enzyme tracer; E. washing; F. assay of enzyme activity.

用ZR所作的标准曲线见图8。B/B_0的logit值与浓度对数成直线关系。用辣根过氧化物酶标记的竞争反应，所测结果的浓度范围是0.25—50pmol，每个测定样重复三次，得

到平均偏差为4.4%，相关系数 γ 等于 - 0.999。当用 B/B_0 对标样的浓度对数作曲线时，得一反 S 型图象。

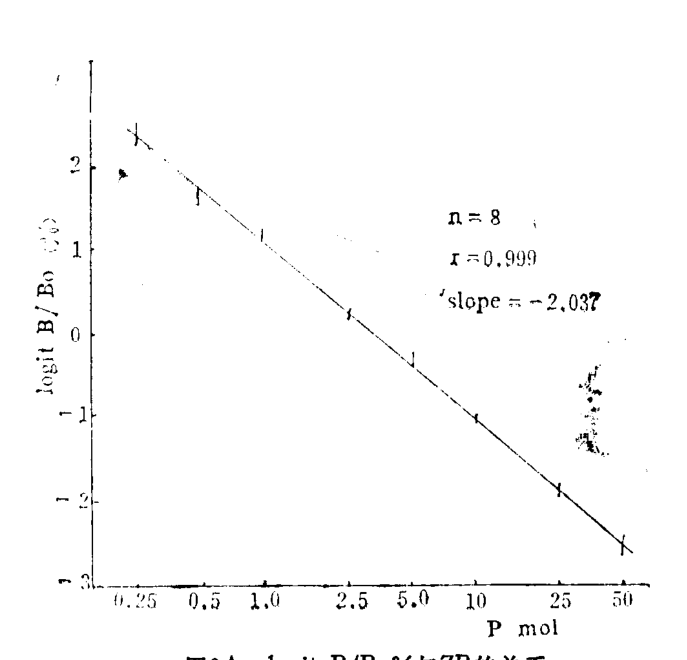


图8A. logit B/B_0%与ZR的关系

Fgi. 8A. The relationship of logit B/B_0(%) and ZR.

图8B. B/B_0(%)与ZR的关系

Fig. 8B. The relationship of B/B_0(%) and ZR.

表2. 六种化合物的交叉反应

Table 2. The cross reaction with six compounds

	化合物 compounds	交叉反应（%）cross reaction
1	Zeatinriboside	100
2	Zeatin	44
3	Isopentenyladenosine	0.52
4	6-benzylaminopurine	1.55
5	6-furfurylaminopurine	0.26
6	Adenosine	0

3.交叉反应试验

从抗血清中分离的 IgG 对于几种嘌呤类化合物作交叉反应除了玉米素外，其余几种化合物的交叉反应均小于 2 %。表 2 是几种作交叉反应的化合物。

（三）风信子（*Hyacinthus orientalis* L.）的测定

1.材　料

用百合科的风信子为实验材料。84年10月26日种下鳞茎，85年 3 月 21 日取整株测定，此时，植株开花状态见图 9 。

将植株分为八个部分：花器官、叶的地上部分、叶的地下部分、鳞茎、根，花葶又分为上、中、下三段。

2.提取方法

植物组织稍加切碎后，加入 3 毫升/克鲜重的80%甲醇，匀浆后在 4 °C、黑暗中提取 3 天，15000 g 离心30分钟，收集上清液。于沉淀中再加入与第一次相同量的80%甲醇，黑暗、4 °C再浸提 4 天，15000 g 离心30分钟。合并两次上清液，减压蒸馏弃去甲醇，用TBS定容，备测定。

3.测定结果

用该方法测定，由于不能确定是玉米素核苷还是玉米素（由于对玉米素的交叉反应大），因此测得量称为玉米素类化合物，又因为标准曲线是以玉米素核苷所制，故测得量亦以玉米素核苷计。测定结果发现，玉米素类化合物在风信子各部分中的含量有较大的差异。含量最高的部位是花器官，最低部位是叶的地下部分。特别有趣的是花葶的上、中、下三段的含量依次下降(图10)。

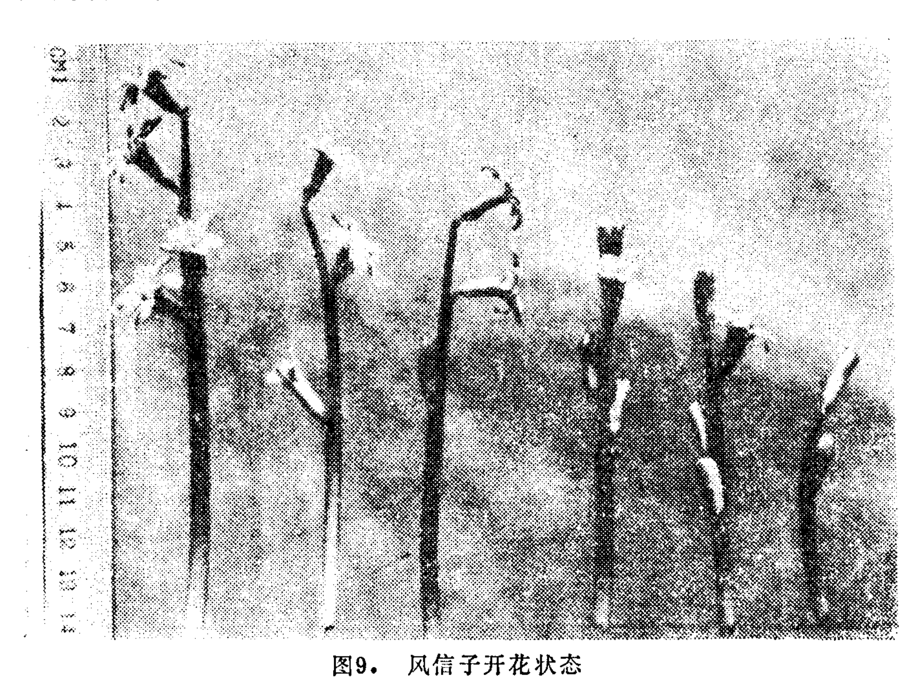


图9. 风信子开花状态

Fig. 9. The flowers of *Hyacinthus orientalis* L.

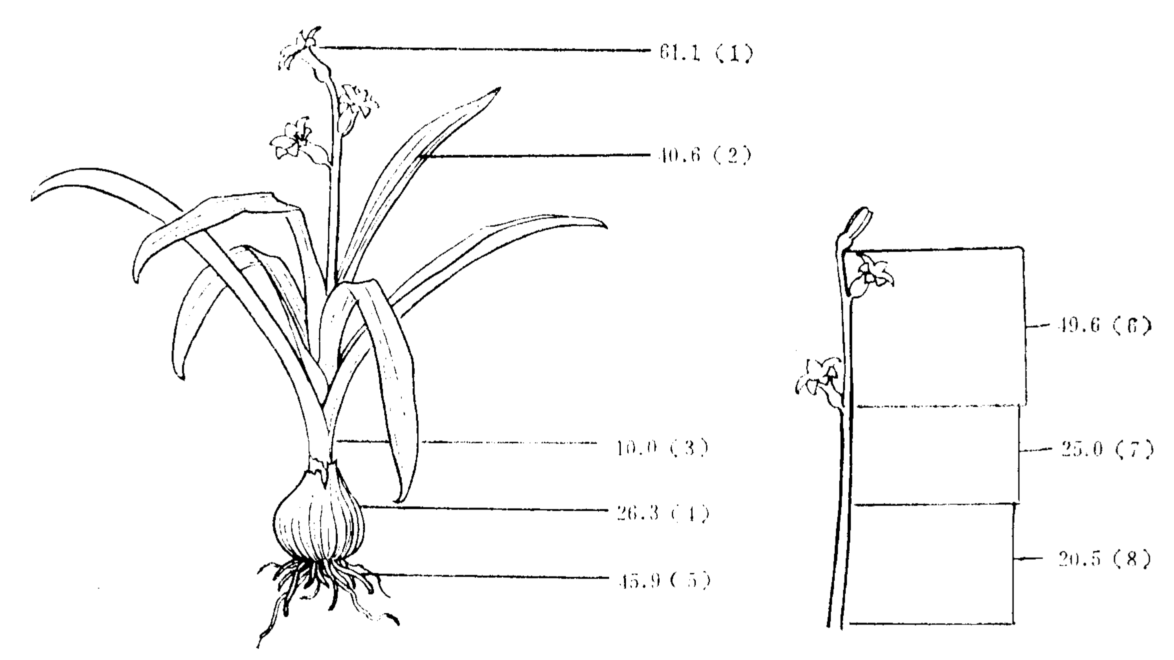


图10. 风信子各部分玉米素类激素的含量（以玉米素核苷计）

（1）花器官；（2）叶的地上部分；（3）叶的地下部分；（4）鳞茎；

（5）根；（6）花序轴；（7）花葶上段；（8）花葶下段。

Fig. 10. The quantity of related zeatin in different parts of *H. orientalis*. L.

Unit: ng/g. F. W. (calculated as zeatinriboside).

(1) flower, (2) leaf blade, (3) basal part of leaf blade, (4) bulb,

(5) root, (6) rachis, (7) upper part of peduncle, (8) basal part of peduncle,

讨　论

酶标免疫测定法与放射免疫测定法相比较，灵敏度不如后者，这是弱点之一。当然，灵敏度的大小与其所用酶种类、纯度和酶标记部位都有关系。Weiller曾经做过赤霉素、生长素和脱落酸的酶标免疫测定，他均用碱性磷酸脂酶作为标记物，似乎是灵敏度较高，但不得不承认，作为标记用的碱性磷酸脂酶的活力单位要相当高，据查为8000单位，这就有两个困难：（1）高活力单位的酶难以保存，从国外运到国内并非易事；（2）价格昂贵。相比之下，辣根过氧化物酶在国内就能买到，纯度也能适用，价格也便宜得多。用邻苯二胺作为HRP的底物，颜色反应灵敏，可满足日常测定的要求。在Weiller的工作中，酶标方式都用酶蛋白的ε-氨基与激素的羧基相连[7、9]，而在本实验中，为了使得ZR与HRP的结合部位和ZR与BSA的结合部位一致，采用过碘酸盐氧化法破坏ZR核糖基上的邻二羟基，与酶蛋白的氨基($-NH_2$)相连，形成Shiff碱，显然，合成原理与羧、氨基相连不同。测得HRP-ZR与HRP的相对酶活力，前者是后者的95%。看来，用过碘酸盐氧化法将ZR连至HRP上，并不会对酶的催化反应能力有显著影响。

另一缺点，也是酶标免疫法的共同特点，即由于采用酶蛋白作为标记物，酶的反应对环境特别敏感，因此，每次的重复性较差，为克服这一缺点，每次测定必需带有标准曲线的制作，以校准系统误差。

又因这一方法单独使用不能判别被测物是玉米素核苷还是玉米素，因此所测得量只能看作是玉米素类激动素。以专一性来讲，虽比生物法高，但不能达到物理化学法如质谱法的要求。

酶标免疫法测定植物内源激素，虽然尚欠完善，而且也有局限性，但也有其本身的优点和潜在的应用价值。测定过程较简便，可成批进行，成本低，所用试剂均易得到。若用40孔板作测定，一只兔子的抗血清约可测定50000以上个样品。到目前为止，国内外未曾有用HRP标记的酶标免疫法测定玉米素类激素的报道。作为一种新方法的尝试，目前只是初步建立了一个雏形，还有很多工作需要进一步深入，有待不断提高。

参 考 文 献

〔1〕 北京医学院微生物教研组，1981：实验免疫学，人民卫生出版社，第264页。
〔2〕 Erlanger, B. F. and San M. Beiser, 1964: Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 52: 68—74.
〔3〕 Helen Van Vunakis, 1980: "Immunochemical Techniques" Part A (Methods in Enzymology V. 70), N. Y. London Toronto Sydney San Francisco, Academic Press, pp. 112—115.
〔4〕 MacMillan, J., 1980: "Hormonal regulation of development I". Springer-Verlag, Berlin Heidelberg N. Y. pp. 242—247.
〔5〕 Miller, C. O., F. Skoog, F. S. Okumura, M. H. Von Saltza, F. M. Strong, 1955: *J. Am. Chem. Soc.*, 77:2662—2663.
〔6〕 ——, 1956: *J. Am. Chem. Soc.*, 78:1375—1380.
〔7〕 Rainer Atzorn and E. W. Weiler, 1983: *Planta*, 159:7—11.
〔8〕 Weiler, E. W., 1980: *Planta*, 149:155—162.
〔9〕 ——, 1981: *Planta*, 153:561—571.

ENZYME-LINKED IMMUNOASSAY (ELISA) FOR ZEATINRIBOSIDE

Xu Rujun, Ji Benren and Duan Jinyu

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract Enzyme-linked immunoassay for the quntitation of zeatinriboside has been studied. Rabbits' antisera produced against bovine serum albumin conjugates of zeatinriboside have a high affinity and a high specificity for zeatinriboside. The antisera show a negligible cross reaction to some cytokinins such as kinetin except zeatin. This assay method is sensitive and measuring ranges extend from 0.25 to 50 pmol/assay of zeatinriboside. The reproducibility is also good. Due to the high specificity of this method, crude extracts may be used for analysis. The method is simple and rapid. And a lot of samples can be analysed in the same time. The quantity of cytokinins levels (calculated as zeatinriboside) in each part of *Hyacinthus orientalis* L. is 10—60ng/g. F. W..

Key words Cytokinin; Zeatinriboside; ELISA